สถาบันวิจัย
วิทยาศาสตร์การแพทย์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาเอ็นซัยม์ LDH, GPI, GDH, 6-PGD และ Peptidase E ในเชื้อมาลาเรียชนิด Plasmodium falciparum ด้วยวิธี starch gel เทียบกับวิธี acrylamide gel electrophoresis

โดย

ผศ. พญ. ธาดา สืบหลินวงศ์
รศ. สดศรี ไทยทอง

จก
วท 15
002950

เสนอ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ตามทุนโครงการวิจัยมาลาเรียที่ 5/2523

พ.ศ. 2526

รายงานฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาเอ็นซัยม์ LDH, GPI, GDH, 6PGD และ Peptidase E ในเชื้อมาลาเรียชนิด Plasmodium falciparum ด้วยวิธี starch gel เทียบกับวิธี acrylamide gel electrophoresis

โดย

ผศ. พญ. ชาดา สืบหลินวงศ์

รศ. สดศรี ไทยทอง

เสนอ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตามทุนโครงการวิจัยมาลาเรียที่ ๕/๒๕๒๓

พ.ศ. ๒๕๒๖

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

/ ฝ่ายวิจัย

สารบัญ

หน้า

รายการภาพประกอบ ก

บทที่

๑. บทนำ ๑

๒. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีทดลอง ๕

๓. ผลการทดลอง ๑๙

๔. วิจารณ์ผลการทดลอง ๓๔

๕. สรุปผลการทดลอง ๓๖

เอกสารอ้างอิง ๓๗

กิตติกรรมประกาศ ๓๘

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ งฬ
วพ15
เลขทะเบียน 002950
วัน.เดือน.ปี 20 ม.ค. 29

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
๑.	แผนภาพที่ ๑ แสดงการจัดตั้งเครื่องมือสำหรับอีเล็คโตรฟอรีซิส	๖
๒.	แผนภาพที่ ๒ อุปกรณ์สำหรับโปลีอะคริละไมด์เจล อิเล็คโตรฟอรีซิส	๘
๓.	แผนภาพแสดงการเคลื่อนที่ของแถบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ LDH ในโปลีอะคริละไมด์เจล	๒๐
๔.	ภาพแสดงการเคลื่อนที่ของแถบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ LDH	๒๑
๕.	แผนภาพแสดงแถบเอ็นซัยม์กลูตาเมท ดีฮัยโดรจีเนส	๒๒
๖.	ภาพแสดงการเคลื่อนที่ของแถบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ GDH	๒๓
๗.	แผนภาพแสดงไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ GPI ที่พบในโปลีอะคริละไมด์เจล	๒๕
๘.	ภาพแสดงการเคลื่อนที่ของแถบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ GPI	๒๖
๙.	แผนภาพแสดงแถบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ peptidase E	๒๗
๑๐.	ภาพแสดงการเคลื่อนที่ของแถบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ Pep E	๒๘
๑๑.	แผนภาพแสดงแถบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ 6-PGD ในโปลีอะคริไมด์เจล	๒๙
๑๒.	ภาพแสดงการเคลื่อนที่ของแถบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ 6 PGD	๓๐
๑๓.	รูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ ADA, GDH และ GPI ที่พบในเชื้อ P. falciparum โดยสตาร์ชเจลอิเล็คโตรฟอรีซิส	๓๑
๑๔.	รูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ LDH, Pep E และ 6 PGD ที่พบในเชื้อ P. falciparum โดยสตาร์ชเจล อิเล็คโตรฟอรีซิส	๓๓

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ ๑
บทนำ

การจำแนกชนิดของสัตว์โดยเฉพาะปาราสิตซึ่งเป็นสัตว์เซลล์เดียว จะแบ่งตามลักษณะรูปร่างของเชื้อปาราสิตออกเป็น specie และ genus ส่วนการจำแนกละเอียดยิ่งขึ้นเช่น การจำแนก Plasmodium falciparum เป็นชนิดย่อยทำได้โดยจำแนกตามระดับการดื้อยาและไวต่อยาในหลอดทดลอง ชนิดของ antigen ทั้งที่อยู่บนพื้นที่ผิวของปาราสิตหรือผิวของเม็ดเลือดแดงที่มีปาราสิต จำแนกตามชนิดของโปรตีนที่พบในปาราสิต ลำดับการเรียงตัวของเบสในกรดนิวคลิอิคของนิวเคลียสในปาราสิต และการจำแนกโดยอาศัยรูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ต่าง ๆ ที่พบในปาราสิต

ไอโซซัยม์คือเอ็นซัยม์ที่มีสัปเสตรทเหมือนกันและเร่งปฏิกิริยาเดียวกัน แต่มีคุณสมบัติทางกายภาพและโครงสร้างต่างกัน จึงสามารถแยกออกจากกันได้โดยวิธีอีเล็คโตรฟอรีซิส ตัวอย่างเช่นเอ็นซัยม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนสที่พบในซีรัมหรือในเลือดคน แต่ละโมเลกุลของเอ็นซัยม์ซึ่งสามารถทำงานได้จะต้องประกอบด้วย ๔ หน่วยย่อยซึ่งมี ๒ ชนิด ได้แก่หน่วยย่อย M และหน่วยย่อย H ดังนั้นโครงร่างโมเลกุลของเอ็นซัยม์แลคเตท ดีไฮโดรจีเนสจึงมี ๕ แบบคือ M_4, M_3H, M_2H_2, MH_3 และ H_4 ทั้งหมดนี้สามารถเร่งปฏิกิริยาเดียวกันคือปฏิกิริยา

$$\text{Lactate} + NAD^+ \longrightarrow \text{Pyruvate} + NADH + H^+$$

และเมื่อนำเอ็นซัยม์ที่มี ๕ รูปแบบนี้มาแยกโดยวิธีอีเล็คโตรฟอรีซีสจะพบว่าสามารถแยกออกเป็น ๕ แถบ ดังนั้นแต่ละโครงร่างโมเลกุลของเอ็นซัยม์แลคเตท ดีไฮโดรจีเนสจึงเป็นแต่ละรูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์แลคเตท ดีไฮโดรจีเนส (Markert & Moller, 1959)

การศึกษารูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ทำได้หลายวิธี เช่น ศึกษาโดยวิธีอิเล็คโตรฟอรีซิส เรซินโครมาโตกราฟี (resin chromatography) ฟิงเกอร์พริ้นท์-แพทเทอร์น (fingerprint pattern) คุณสมบัติทางอิมมูโนโลยี่ และคุณสมบัติทางจลน์ศาสตร์ของเอ็นซัยม์ แต่ที่นิยมมากได้แก่การศึกษารูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์โดยวิธี

อิเล็คโตรฟอรีซิส (Kaplan, 1963; Brodie and Ryckman, 1967; Carter and Walliker, 1977) ร่วมกับการย้อมสีทางฮีสโตเคมีเพื่อดูแถบหรือรูปแบบของไอโซซัยม์

อิเล็คโตรฟอรีซิสเป็นเทคนิคซึ่งใช้สำหรับแยกสารที่มีประจุไฟฟ้าออกจากกัน โดยอาศัยหลักการว่า สารที่มีประจุไฟฟ้าต่างกัน จะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วต่างกันในสนามไฟฟ้า นอกจากนี้สารที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันแต่ประจุไฟฟ้าต่างกัน สารที่มีประจุไฟฟ้ามากกว่าจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า แต่ถ้าเป็นสารที่มีประจุไฟฟ้าเท่ากันขนาดโมเลกุลต่างกัน สารโมเลกุลเล็กกว่าจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า สารที่มีประจุไฟฟ้า - จะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวกของสนามไฟฟ้า และสารที่มีประจุไฟฟ้า + จะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วลบ ประจุไฟฟ้าของสารที่ถูกนำมาแยกจะแตกต่างกันได้นั้นขึ้นอยู่กับความเป็นกรดด่าง (pH) ของบัฟเฟอร์ซึ่งใช้ในการแยกนั้น ๆ

อิเล็คโตรฟอรีซิสยังแบ่งเป็นหลายชนิดเรียกชื่อแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสารตัวกลาง (medium) ที่ใช้ช่วยแยก ตัวอย่างเช่น สตาร์ชเจล อิเล็คโตรฟอรีซิส (starch gel electrophoresis) ตัวกลางคือ hydrolysed potato starch เปเปอร์อิเล็คโตรฟอรีซิส (paper electrophoresis) ตัวกลางเป็น กระดาษ เซลลูโลสอิเล็คโตรฟอรีซิส (cellulose electrophoresis) ตัวกลางเป็น เซลลูโลสเม็มเบรน และ โปลีอะคริละไมด์ เจล อิเล็คโตรฟอรีซิส (polyacrylamide gel electrophoresis) ตัวกลางได้แก่โปลีอะคริละไมด์เจลเป็นต้น แต่ละเทคนิคดังกล่าวนี้มีข้อดีข้อเสียและข้อจำกัดในการแยกสารที่มีประจุไฟฟ้าได้ต่างกัน เทคนิคที่ได้ถูกนำมาใช้ในด้านจำแนกสัตว์และศึกษาพันธุกรรมศาสตร์ (genetics) ของสัตว์ได้แก่วิธีสตาร์ชเจลอิเล็คโตรฟอรีซิส Carter และคณะ (1970) ได้ใช้การศึกษารูปแบบไอโซซัยม์ในเชื้อปาราสิตเพื่อจำแนกเชื้อมาลาเรียในสัตว์ฟันแทะ (rodent malaria) ซึ่งได้แก่ P. berghei,

P. chabaudi, P. vinckei และ P. yoelii รูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ที่ศึกษาได้แก่ glucose phosphate isomerase (GPI; EC 5.3.1.9), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD; EC 1.1.1.44), lactate dehydrogenase (LDH; EC 1.1.1.27) และ glutamate dehydrogenase (GDH; EC 1.4.1.2) ซึ่งสามารถจำแนก P. yoelii ออกเป็น ๓ ชนิดย่อย P. vinckei ออกเป็น ๕ ชนิดย่อย และ P. chabaudi ออกเป็น ๖ ชนิดย่อย

เชื้อมาลาเรียที่แพร่ระบาดในคนมี ๔ ชนิดได้แก่ P. falciparum, P. ovale, P. vivax และ P. malariae การจำแนกชนิดย่อยโดยอาศัยรูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ในเชื้อปาราสิตได้ศึกษาใน P. falciparum โดย Carter และคณะ (1973, 1975) ได้ทำการศึกษารูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ ๔ ตัวคือ GPI, 6-PGD, GDH และ LDH ในเชื้อมาลาเรียซึ่งเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียในประเทศ Gambia และ Tanzania โดยวิธีสตาร์ชเจล อิเล็กโตรฟอรีซิส และพบว่า P. falciparum ที่เก็บตัวอย่างได้นั้นเมื่อแยกโดยไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ GPI จะได้ ๒ ชนิดย่อยเรียก P. falciparum GPI_1 และ P. falciparum GPI_2 P. falciparum ที่แยกชนิดย่อยโดยไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ LDH สามารถแบ่งเป็น ๒ ชนิดย่อยเช่นกันเรียก P. falciparum LDH_1 และ P. falciparum LDH_2 ส่วนรูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ 6-PGD ที่พบใน P. falciparum ซึ่งเก็บตัวอย่างจากประเทศ Gambia สามารถแยกเป็นชนิดย่อยได้ ๓ ชนิดคือ P. falciparum 6-PGD_1, P. falciparum 6-PGD_2 และ P. falciparum 6-PGD_3 โดยที่ไม่พบ 6 PGD_2 และ 6 PGD_3 ในตัวอย่างเชื้อมาลาเรียที่เก็บจากประเทศ Tanzania.

การศึกษาในลักษณะเดียวกับของ Carter และคณะ (1973, 1975) ในประเทศไทยนั้น Thaithong และคณะ (1981) ได้ศึกษารูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ ๖ ตัวใน P. falciparum โดยวิธีสตาร์ชเจล อิเล็กโตรฟอรีซิส เอ็นซัยม์ทั้ง ๖ ตัวนั้นได้แก่ GPI, GDH, LDH, 6-PGD, adenosine deaminase (ADA; EC 3.5.4.4) และ peptidase E (Pep E; EC 3.4.11 or 13) ตัวอย่างเชื้อปาราสิตที่นำมาศึกษา

เก็บจากผู้ป่วยมาลาเรียในแถบจังหวัด ชลบุรี จันทบุรี สระบุรี กาญจนบุรี สงขลา และตาก จากรูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ GPI พบว่าสามารถจำแนก P. falciparum ออกเป็น ๓ ชนิดย่อยคือ GPI_1, GPI_2 และ GPI_3 (พบเพียง ๑ ตัวอย่าง) ส่วนไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ ADA พบได้ ๒ แบบคือ ADA_1 และ ADA_2 นอกจากนั้นไม่มีความแตกต่างในรูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ GDH, LDH, 6PGD และ PepE ทั้งนี้อาจเกิดขึ้นจากหลายสาเหตุ เป็นต้นว่า เทคนิคของสตาร์ชเจล อิเล็คโตรฟอรีซิสโดยตัวของมันเองไม่สามารถใช้แยกความแตกต่างเล็ก ๆ น้อยออกจากกัน (Singh และคณะ, ๑๙๗๖) เนื่องจากการดัดแปลงสตาร์ชเจลทำได้จำกัด สาเหตุอีกประการหนึ่งอาจจะเกิดจากตัวเชื้อ P. falciparum มีไอโซซัยม์ของแต่ละเอ็นซัยม์ที่พบเพียงรูปแบบเดียว หรือรูปแบบไอโซซัยม์ที่มีอยู่อาจซ้อนกันเนื่องจากตัวอย่างที่นำมาศึกษาไม่ใช่สายพันธุ์บริสุทธิ์ (clone) จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นผู้วิจัยจึงคิดเปลี่ยนเทคนิคการศึกษารูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ GPI, GDH, LDH, 6-PGD และ PepE จากวิธีสตาร์ชเจล อิเล็คโตรฟอรีซิสเป็น วิธีโปลีอะคริละไมด์เจล อิเล็คโตรฟอรีซิส

โปลีอะคริละไมด์เจล อิเล็คโตรฟอรีซิสเป็นเทคนิคซึ่งถูกนำมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน และเอ็นซัยม์ต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง (Chrambach และคณะ, 1971, Weber และคณะ, 1975) เนื่องจากสามารถจะแปรสภาพการณ์ต่าง ๆ เช่น การแปรสภาพความเป็นกรดด่าง การแปรความเข้มข้นของอะคริละไมด์เจลและการทำ gradient gel ตลอดจนถึง isoelectrofocusing gel และ two dimension gel electrophoresis เป็นต้น การแปรสภาพได้หลายรูปแบบอาจช่วยให้แยกความแตกต่างเล็ก ๆ น้อย ๆ ออกจากกันได้เด่นชัดขึ้น ข้อดีของโปลีอะคริละไมด์เจล อิเล็คโตรฟอรีซิสอีกประการคือ การประหยัดเวลาเนื่องจากสามารถเตรียมเจล แยกด้วยกระแสไฟฟ้าและย้อมสีเสร็จจนเห็นแถบไอโซซัยม์เสร็จภายในวันเดียวต่างจากสตาร์ชเจลซึ่งต้องการเวลา ๑-๒ วัน นอกจากนี้แผ่นโปลีอะคริละไมด์เจลที่ย้อมสีแล้วยังสามารถจะเก็บไว้ได้อย่างถาวรโดยตากไว้ในอุณหภูมิห้องเพียง ๑ คืนเท่านั้น ทั้งยังเป็นที่ยอมรับกันว่า resolution ของแถบไอโซซัยม์และโปรตีนต่าง ๆ บนแผ่นโปลีอะคริละไมด์เจลมีความชัดเจนกว่าในสตาร์ชเจลจึงน่าจะเป็นประโยชน์ในการแยกความแตกต่างที่แยกไม่ได้โดยสตาร์ชเจล

บทที่ ๒
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุ

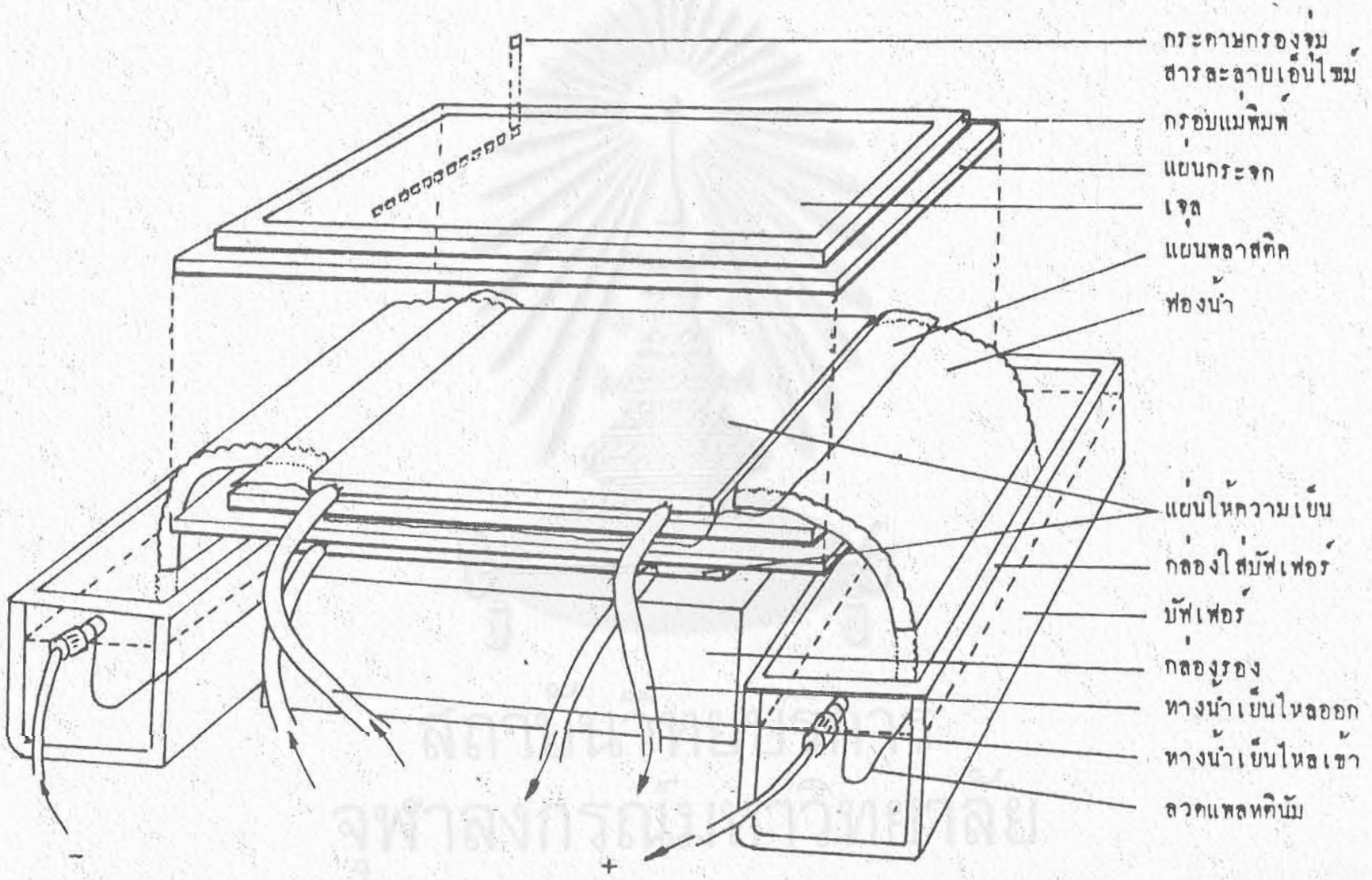
เชื้อ P. falciparum 20 ไอโซเลท (isolate) ซึ่งเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยมาลาเรียจากจังหวัดที่มีการแพร่ระบาดเช่น จันทบุรี ชลบุรี ตาก กาญจนบุรี สระบุรี และสงขลาถูกนำมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (in vitro cultivation) เพื่อเพิ่มเปอร์เซนต์ปาราสิตจนสูงถึง 3% ที่ห้องปฏิบัติการโครงการวิจัยมาลาเรีย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย แยกเม็ดเลือดแดงออกโดยทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วย 0.15% saponin ในปริมาตรเท่ากัน ล้างเชื้อปาราสิตด้วย 0.15 M NaCl 2 ครั้ง บรรจุตัวอย่างเชื้อปาราสิตใส่หลอดแก้วเล็ก ๆ (capillary) หลอดละ 75-100 ul ลนไฟปิดปลายหลอดแก้วทั้งสองข้าง ติดชื่อไอโซเลท เก็บตัวอย่างเชื้อปาราสิตเหล่านี้ไว้เพื่อศึกษาเอ็นซัยม์ในถังบรรจุไนโตรเจนเหลว

2.2 สารเคมี

สารเคมีและเอ็นซัยม์ซึ่งใช้ในงานวิจัยทั้งหมดเป็นชนิด analytical grade (AR) จาก Sigma & Co.

2.3 อุปกรณ์

2.3.1 อุปกรณ์สำหรับทำสตาร์ชเจล อิเล็คโตรฟอรีซิสประกอบด้วย กล่องพลาสติกซึ่งติดลวดแพลทตินัมเพื่อเป็นขั้วไฟฟ้า 2 กล่องสามารถบรรจุบัฟเฟอร์ได้กล่องละ 500 มิลลิลิตร เครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรงซึ่งจ่ายกระแสไฟฟ้าออกได้ 150 มิลลิแอมแปร์ ความต่างศักย์ 500 โวลท์ (power supply; Shandon) แผ่นฟองน้ำทำหน้าที่เป็นสะพานไฟฟ้า (bridge) กระจกและกรอบแม่พิมพ์พลาสติกสำหรับบรรจุสตาร์ชเจล แผ่นให้ความเย็น (cooling plate) 2 แผ่นสำหรับควบคุมอุณหภูมิของสตาร์ชเจลขณะผ่านกระแสไฟฟ้าให้อยู่ระหว่าง 4°C ซึ่งจะประกบสตาร์ชเจลไว้และต่อเข้ากับเครื่องจ่ายน้ำเย็น การจัดตั้งอุปกรณ์สำหรับทำสตาร์ชเจล อิเล็คโตรฟอรีซิส เป็นดังแผนภาพที่ 1



แผนภาพที่ 1 แสดงการจัดตั้งเครื่องมือสำหรับอีเล็คโตรฟอรีซีส

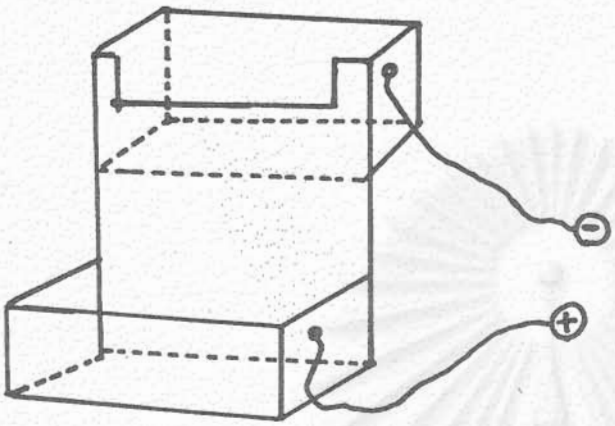
2.3.2 อุปกรณ์สำหรับทำโปลีอะคริละไมด์เจล อิเล็คโตรฟอรีซิส ประกอบด้วย กล่องบรรจุบัฟเฟอร์ขนาดบรรจุ 500 มิลลิลิตร 2 กล่องประกบติดกับแผ่นพลาสติกตั้งอีกแผ่นหนึ่ง กล่องบัฟเฟอร์บนจะมีรอยบากเป็นช่องสี่เหลี่ยมเพื่อให้บัฟเฟอร์ไหลผ่านแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างกระจกได้ ต่อลวดแพลทตินั่มทั้งกล่องบนและล่าง บนเป็นขั้วไฟฟ้าลบ ล่างเป็นขั้วไฟฟ้าบวก แผ่นกระจกขนาดเท่ากัน 2 แผ่น ความกว้างของกระจกจะต้องให้ใส่ลงในกล่องบัฟเฟอร์ได้ กระจกแผ่นหนึ่งต้องมีรอยบากขนาดเดียวกับรอยบากของกล่องบัฟเฟอร์บน แผ่นพลาสติกหนา 1 มิลลิเมตร ตัดเป็นชี่คล้ายหวี 6 ชี่ แต่ละชี่กว้าง 2 เซนติเมตรยาว 2.5 เซนติเมตร ความยาวของแผ่นพลาสติกชี่หวีต้องน้อยกว่าความกว้างของแผ่นกระจก 3 เซนติเมตร แผ่นชี่หวีนี้ใช้ปิดด้านบนของแผ่นกระจกเมื่อประกบกระจกเข้าด้วยกัน และปิดด้านข้างอีก 3 ด้าน ด้วยแผ่นพลาสติกหนา 1มิลลิเมตรให้เกิดเป็นช่องสำหรับบรรจุโปลีอะคริละไมด์เจล เมื่อเจลแข็งตัวและดึงแผ่นชี่หวีออก ด้านบนของเจลจะเกิดเป็นช่อง 6 ช่องสำหรับบรรจุตัวอย่างสารที่ต้องการแยกด้วยกระไฟฟ้า เครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรง (power supply, Shandon) อุปกรณ์สำหรับทำโปลีอะคริละไมด์เจล อิเล็คโตรฟอรีซิสได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 2

2.4 วิธีการทดลอง

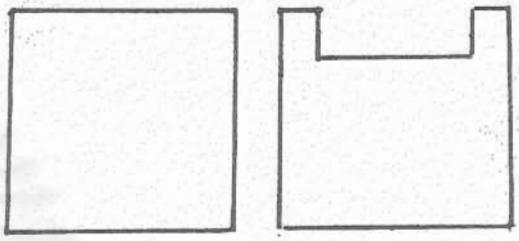
2.4.1 การศึกษารูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์แลคเตท ดีไฮโดรจีเนส (LDH) โดยวิธีโปลีอะคริละไมด์เจล อิเล็คโตรฟอรีซิส (Dietz & Lubrano, 1967) ซึ่งจะประกอบด้วยการเตรียมโปลีอะคริละไมด์เจลชนิดแผ่น (slab gel) ทั้ง 5% และ 7.5% บัฟเฟอร์สำหรับผ่านกระแสไฟฟ้า (electrode buffer) สีไข่ยอม (staining buffer) ดังต่อไปนี้

2.4.1.1 วิธีเตรียมแผ่นเจลขนาดหนา 1 มิลลิเมตร กว้าง 15.0 เซนติเมตรและยาว 16.0 เซนติเมตรซึ่งบรรจุสารละลายได้เกือบ 25 มิลลิลิตร จึงเตรียมสารละลายเจลครั้งละ 32 มิลลิลิตร จะประกอบด้วยสารละลายดังนี้

Solution A ประกอบด้วย 18.15 กรัม tris (hydroxymethyl) aminomethane และ 24 มิลลิลิตร 1 N HCl ละลายในน้ำเป็น 50 มิลลิลิตร pH 8.9

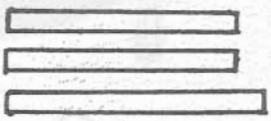


กล่องบัฟเฟอร์



แผ่นกระจก

แผ่นซี่หวี



พลาสติคปิดด้านข้าง

แผนภาพที่ 2 อุปกรณ์สำหรับโปลีอะคริละไมด์เจล อิเล็คโตรฟอรีซิล

Solution B ประกอบด้วย 15 กรัม acrylamide และ 0.4 กรัม N,N-methylene-bis-acrylamide ละลายในน้ำ 50 มิลลิลิตร

Solution C 1.4% ammonium persulfate

ความเข้มข้นของเจลซึ่งใช้ศึกษาได้แก่ 5% และ 7.5 % เตรียมตามสูตรดังนี้

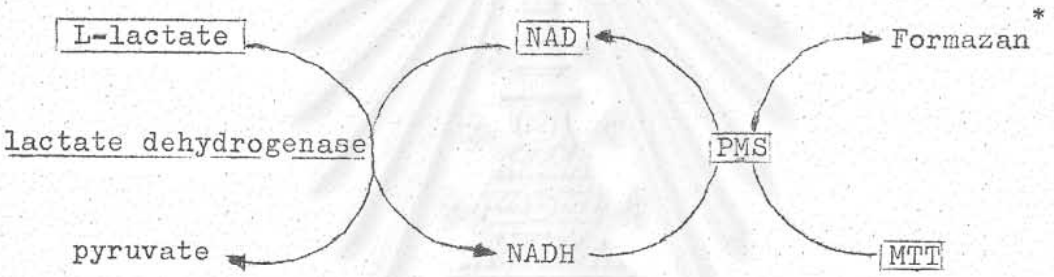
	5% polyacrylamide gel		7.5% polyacrylamide gel	
solution A	5.0	มล.	5.0	มล.
solution B	5.0	"	7.5	"
solution C	2.2	"	2.2	"
TEMED (N,N,N,N-tetramethylethylenediamine)	0.04	"	0.04	"
H_2O	19.76		17.26	

2.4.1.2 อิเล็คโทรดบัฟเฟอร์ (electrode buffer) ได้แก่ 0.05M Tris/0.04 M glycine, pH 8.3

2.4.1.3 การเตรียมตัวอย่างและแยกไอโซซัยม์ของแลคเทท ดีไฮโดรจีเนส ทำโดยนำตัวอย่างที่ต้องการจากหลอดแก้วเล็ก ๆ ที่เก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวออกมาถ่ายใส่ถาดหลุมบนแผ่นสไลด์หรือ microtitrator plate หยดสารละลาย 1% Triton X-100 ใน Tris HCl/EDTA/Dithiothreitol buffer 1-2 หยด ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายเอ็นซัยม์ของปาราสิตเนื่องจาก TritonX-100 ทำให้เยื่อหุ้มตัวปาราสิตแตกออก ตัวอย่างเอ็นซัยม์จากเชื้อปาราสิตและตัวอย่างเอ็นซัยม์ของเม็ดเลือดแดงที่ปราศจากเชื้อปาราสิต (=control) จะถูกหยอดลงในช่องบรรจุตัวอย่างทางด้านบนของแผ่นเจลซึ่งติดกับกล่องบัฟเฟอร์และเติมอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ไว้แล้วภายหลังจากที่ได้ผสมเข้ากันกับ 40% sucrose1-2หยดเพื่อให้ sucrose ช่วยพาสารละลายเอ็นซัยม์ที่ต้องการศึกษาจมลงถึงก้นช่องบรรจุหรือ origin line ต่อกระแสไฟฟ้าชนิดกระแสตรงเข้าที่ขั้วบนเป็นลบขั้วล่างเป็นบวก ขนาดของกระแสที่ใช้ไม่ควรเกิน 30 มิลลิแอมแปร์ ความต่างศักย์ไฟฟ้าอยู่ระหว่าง 200-300 โวลท์ เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมงหรือจนกระทั่งแถบของฮีโมโกลบินสีแดงเคลื่อนที่ต่ำจากจุดเริ่มต้นเป็นระยะทาง 7 - 8 เซนติเมตร จึงหยุดกระแสไฟฟ้า

และนำเจลมาย้อม เจลหนึ่งแผ่นจะบรรจุตัวอย่างได้ครั้งละ 6 ตัวอย่าง รวมทั้ง control speciemen ด้วย

2.4.1.4 การย้อมสีเอ็นซัยม์แลคเตท ดีไฮโดรจีเนส นำแผ่นโปลีอะคริลาไมด์เจลซึ่งแยกเอ็นซัยม์โดยกระแสไฟฟ้าจาก 2.4.1.3 แล้ววางบนแผ่นพลาสติกซึ่งตัดให้มีขนาดพอเหมาะกับแผ่นเจล อาจจะตัดส่วนปลายของเจลซึ่งแถบของเอ็นซัยม์เคลื่อนที่ไม่ถึงออกได้ นำแผ่นพลาสติกที่มีเจลติดอยู่วางในถาด เทสีย้อมให้ท่วมตลอดแผ่นเจล นำถาดไปวางไว้ในตู้อบร้อนอุณหภูมิ 37-40°C ตั้งทิ้งไว้ 20-30 นาที แถบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์จะปรากฏเป็นแถบสีม่วงของ formazan (Harris & Hopkinson, 1976) ดังต่อไปนี้



สารละลายซึ่งเป็นสีย้อมเจล 25 มิลลิลิตรประกอบด้วย

0.05 M Tris/HCl pH 8.0	25	มิลลิลิตร
lithium lactate	100	มิลลิกรัม
NAD	5	"
PMS	5	"
MTT	5	"

2.4.1.5 การบันทึกผลแถบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ แลคเตท ดีไฮโดรจิเนส จะต้องแยกแถบไอโซซัยม์ที่ติดสีย้อมออกเป็น แถบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์จากเชื้อ P. falciparum และแถบไอโซซัยม์ของแลคเตท ดีไฮโดรจีเนสจากเม็ดเลือดแดงที่เป็นโฮสต์จากกันซึ่งทำได้ไม่ยาก เนื่องจากในทุกเจลจะบรรจุตัวอย่างซึ่งเป็นเม็ดเลือดแดงที่

ปราศจากปาราสิตอยู่ด้วย ดังนั้นแถบเอ็นซัยม์ที่พบในตัวอย่างเลือดที่มีเชื้อปาราสิตแต่ไม่พบในตัวอย่างเลือดปราศจากเชื้อ ถือว่าแถบนั้นเป็นแถบที่เกิดจากเอ็นซัยม์ของปาราสิต การบันทึกอาจทำได้ 3 วิธีดังนี้

- ลอกแบบ ทำโดยนำแผ่นพลาสติกบาง ๆ วางทาบบนแผ่นเจลซึ่งย้อมสีแล้ว ใช้ปากกาเมจิกชนิดกันน้ำวาดแถบไอโซซัยม์ที่ปรากฏบนแผ่นเจลทุกแถบพร้อมทั้งบันทึกไอโซเลทตำแหน่งจุดเริ่มต้นที่บรรจุตัวอย่าง ทิศทางขั้วไฟฟ้าบวกและขั้วลบ

- ทำเจลให้แห้งเพื่อเก็บเจลไว้ถาวร นำแผ่นเจลที่ย้อมสีแล้ววางบนกระดาษกรองขนาดพอดีกับเจล กดำแผ่นเจลบนแผ่นพลาสติกให้กระดาษกรองอยู่ด้านบนตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 1 คืน เจลจะแห้งติดกระดาษกรอง บันทึกชื่อไอโซเลท ทิศทางขั้วไฟฟ้าบวกลบ เก็บแผ่นเจลเข้าแฟ้มได้

- ถ่ายภาพ ควรถ่ายภาพขณะที่แผ่นเจลยังเปียกอยู่ จึงจะได้ลักษณะแถบไอโซซัยม์ที่ชัดเจน

2.4.2 การศึกษารูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์กลูตาเมท ดีไฮโดรจีเนส (GDH) โดยโปลีอะคริลาไมด์เจล อิเล็คโตรฟอรีซิส ได้ดัดแปลงจากวิธีของ Hempelman & Wilson (1980) โดยใช้ 7.5% เจลขนาด 1x150x160 มิลลิเมตรดังนี้

2.4.2.1 วิธีเตรียมเจล สารละลายต่าง ๆ ซึ่งใช้ในการเตรียมเจลได้แก่

Solution A ประกอบด้วย 7.266 กรัม tris และ 10.0 มิลลิลิตร 1 N HCl ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร pH 8.6

Solution B ประกอบด้วย 15 กรัม acrylamide และ 0.4 กรัม bisacrylamide ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

solution C เป็น 1.4% ammonium persulfate

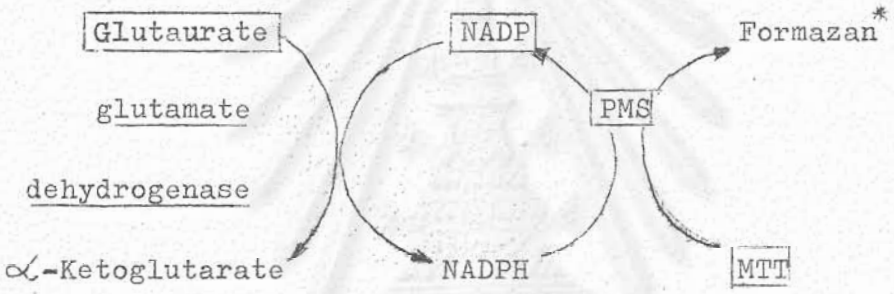
การเตรียม 7.5% เจลทำตามสูตรดังนี้

Solution A	3.13	(=0.15 M tris)
Solution B	6.25	(=7.5% gel)
Solution C	1.80	(=0.1%)
Glycerol	5.00	(=20% v/v)
TEMED	0.013	(=0.05%)
H_2O	8.81	
Total volume	25.0	

2.4.2.2 อิเล็คโทรดบัฟเฟอร์ประกอบด้วย 0.6 กรัม tris และ 1.0 กรัม glycine ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

2.4.2.3 การเตรียมตัวอย่างและทำอิเล็คโตรฟอรีซิสเพื่อแยกรูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ กลูตาเมท ดีไฮโดรจีเนส เป็นเช่นเดียวกับวิธีการของเอ็นซัยม์แลคเตท ดีไฮโดรจีเนส (2.4.1.3)

2.4.2.4 การย้อมสีเอ็นซัยม์กลูตาเมท ดีไฮโดรจีเนสและบันทึกผล ดำเนินตาม 2.4.1.4 และ 2.4.1.5 แถบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์กลูตาเมทจะปรากฏเป็นแถบสีม่วงของ formazan ดังปฏิกิริยา



ส่วนประกอบของสารละลายสี่ย้อม 25 มิลลิลิตร

0.05 M Tris/HCl pH 8.0	25	มิลลิลิตร
Monosodium glutamate	100	มิลลิกรัม
NADP	5	"
MTT	5	"
PMS	5	"

2.4.3 การศึกษารูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์กลูโคสฟอสเฟต ไอโซเมอเรส (GPI) โดยวิธีโปลีอะคริลาไมด์เจล อิเล็คโตรฟอรีซิส

2.4.3.1 วิธีเตรียมเจล 7.0% ขนาด 1x150x160 มิลลิเมตร จากสารละลายต่าง ๆ ดังนี้

Solution A ประกอบด้วย 6 กรัม tris และ 10 กรัม glycine ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร pH 8.7

Solution B และ Solution C เช่นเดียวกับใน 2.4.1.1

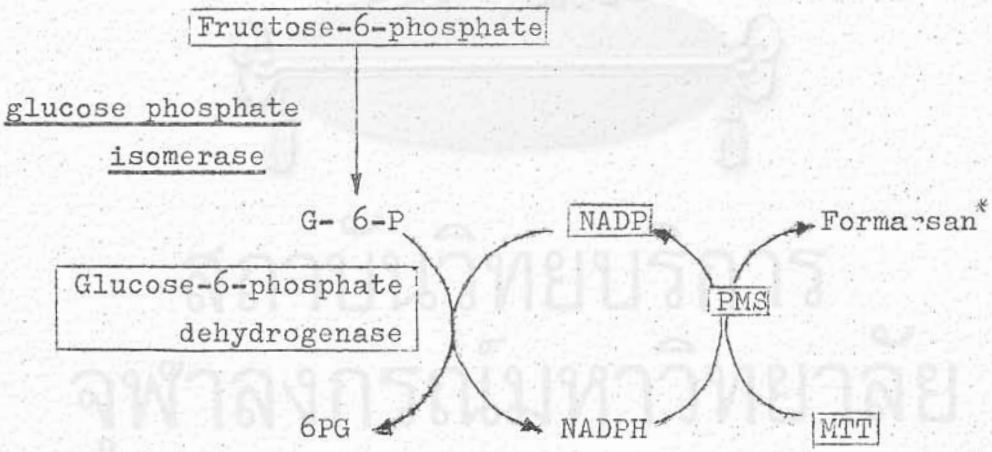
การเตรียม 7% เจลทำดังสูตรต่อไปนี้

Solution A	4.0	มิลลิลิตร
Solution B	7.5	"
Solution C	2.2	"
TEMED	0.02	"
H_2O	16.26	"

2.4.3.2 อิเล็คโทรดบัฟเฟอร์เตรียมจากการนำ solution A มาเจือจาง 1:10 ด้วยน้ำกลั่น

2.4.3.3 การเตรียมตัวอย่างและอิเล็คโตรฟอรีซิสเพื่อแยกรูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์กลูโคสฟอสเฟต ไอโซเมอเรส ทำเช่นเดียวกันใน 2.4.1.3 แต่ตอง pre-run เจลด้วยกระแส 10-15 มิลลิแอมแปร์เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมงก่อนบรรจุตัวอย่างลงเจล

2.4.3.4 วิธีย้อมสีและบันทึกผลรูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์กลูโคสฟอสเฟต ไอโซเมอเรสเป็นเช่นเดียวกับใน 2.4.1.4 และ 2.4.1.5 ส่วนปฏิกิริยาที่ใช้ย้อมเป็นดังนี้



สารละลายสีย้อมเจล 25 มิลลิลิตรประกอบด้วย

0.05M Tris/HCl pH 8.0	25	มิลลิลิตร
Disodium fructose-6-phosphate	25	มิลลิกรัม
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (500U/ml)	10	ไมโครลิตร

NADP	5	มิลลิกรัม
MTT	5	"
PMS	5	"

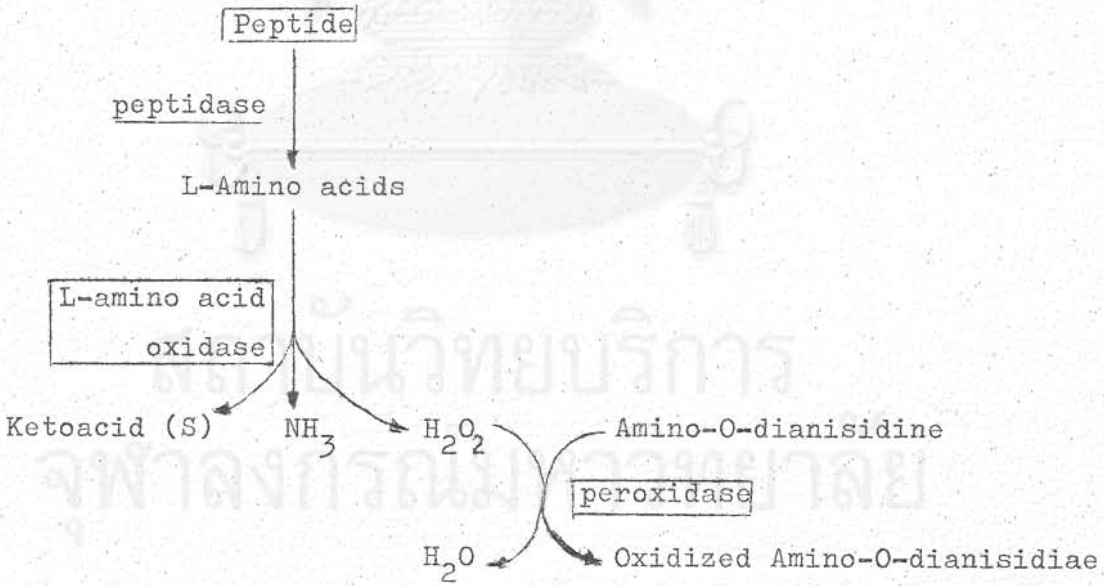
2.4.4 การศึกษารูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์เปปติเดส อี (Pep E) โดยโปลีอะคริละไมด์เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส

2.4.4.1 วิธีเตรียมเจลตลอดจนสารละลายต่าง ๆ เป็นเช่นเดียวกับ 2.4.3.1

2.4.4.2 เช่นเดียวกับใน 2.4.3.2

2.4.4.3 เช่นเดียวกับ 2.4.3.3 แต่ไม่ต้อง pre-rum เจลก่อนบรรจุตัวอย่าง

2.4.4.4 วิธีย้อมสีและบันทึกผลรูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์เปปติเดสอี เป็นเช่นเดียวกับ 2.4.1.4 และ 2.4.1.5 แถบไอโซซัยม์สีน้ำตาลอมแดงเกิดขึ้นได้ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้



หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลายสีย้อม 25 มิลลิลิตรประกอบด้วย

0.02 M citrate phosphate pH 5.5	25	มิลลิลิตร
Peptides (eg. tri-tyrosine)	15	มิลลิกรัม
Snake venom L-amino acid oxidase	6	"
Peroxidase	6	"
O-dianisidine	15	"
$MnCl_2$	10	"

2.4.5 การศึกษารูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ 6 -ฟอสฟอกลูโคเนต ดีไฮโดรจีเนส (6PGD) โดยวิธีโปลีอะคริละไมด์เจล อิเล็คโตรฟอรีซิส

2.4.5.1 วิธีเตรียมเจล 7% ขนาด 1x150x160 มิลลิเมตรเป็นเช่นเดียวกับ 1.4.1.1 สารละลายที่เป็นส่วนประกอบของเจลได้แก่

Solution A คือ 0.1 M phosphate buffer pH 7.0

Solution B และ C คล้ายกันใน 2.4.1.1

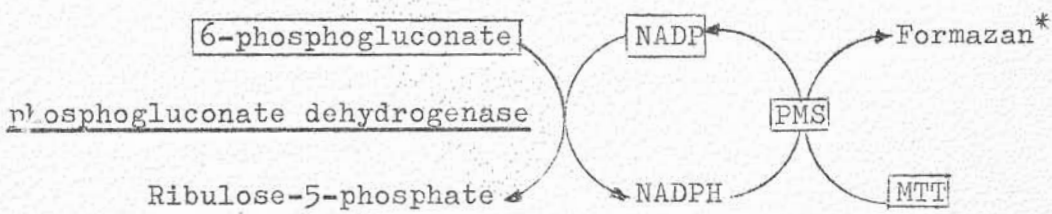
วิธีเตรียม 7% เจลทำได้ดังนี้

Solution A	3.13	มิลลิลิตร
Solution B	6.25	"
Solution C	1.80	"
TEMED	0.013	"
H_2O	13.81	"

2.4.5.2 อิเล็คโทรดบัฟเฟอร์ ใช้ 0.1 M Citrate phosphate, pH 7.0

2.4.5.3 การเตรียมตัวอย่างและแยกไอโซซัยม์เป็นเช่นเดียวกับ 2.4.1.3

2.4.5.4 วิธีย้อมสีและบันทึกผลรูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ 6PGD เป็นเช่นเดียวกับใน 2.4.1.4 และ 2.4.1.5 ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการย้อมสีเป็นดังนี้



024501

สารละลายสีย้อม 25 มิลลิลิตรประกอบด้วย

.05 M Tris/HCl pH 8.0	25	มิลลิลิตร
6-phosphogluconate (barium salt)	25	มิลลิกรัม
$MgCl_2$	20	"
MTT	5	"
PMS	5	"

2.4.6 การศึกษาเอ็นซัยม์ LDH, GDH, GPI, PepE และ 6 PGD โดยวิธีสตาร์ชเจลอิเล็คโตรฟอรีซิส

2.4.6.1 วิธีเตรียมสตาร์ชเจล ชั่งแป้ง 22.5 กรัมละลายในบัฟเฟอร์ 250 มิลลิลิตร ใส่ขวดทรงกรวยที่มีแขนข้างขนาด 1 ลิตร เขย่าให้แป้งกระจายตัวเข้ากับน้ำ ต้มบนเตาไฟฟ้า เขย่าตลอดเวลาที่ต้มจนแป้งสุกใส ยกลง ปิดปากขวดด้วยจุกยาง ต่อแขนข้างขวดเข้ากับสายยางของเครื่อง vacuum pump เพื่อดูดฟองอากาศที่แทรกตัวอยู่ในเนื้อเจลออก ต้อง degas จนได้ฟองอากาศโต ๆ เพียง 1-2 ฟอง เทเจลลงในแบบพิมพ์ซึ่งประกอบด้วยกระจกหนา 6 มิลลิเมตร กว้าง 22 x 22 เซนติเมตรและกรอบพลาสติกสี่เหลี่ยมขนาดภายใน 18x18 เซนติเมตร วางทาบบนกระจก ตั้งเจลทิ้งไว้ให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้องประมาณครึ่งชั่วโมง จึงยกเข้าตู้เย็น ต้องเก็บเจลไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมงก่อนจะนำไปใช้

2.4.6.2 เจลบัฟเฟอร์ อิเล็คโตรดบัฟเฟอร์ กระแสไฟฟ้าและเวลาที่ใช้ในการแยกรูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ LDH, GDH, GPI, PepE และ 6PGD มีดังต่อไปนี้

<u>LDH</u>

อิเล็คโตรดบัฟเฟอร์ : 55 กรัม tris และ 33 กรัม citric acid ละลายในน้ำให้เป็น 1 ลิตร

เจลบัฟเฟอร์ : อิเล็คโตรดบัฟเฟอร์เจือจาง 1 : 7

กระแสไฟฟ้า : 70 มิลลิแอมแปร์คงที่

ระยะเวลา : 15.5 ชั่วโมง

GDH

อิเล็คโตรดบัฟเฟอร์ เจลบัฟเฟอร์ กระแสไฟฟ้า และระยะเวลาเป็นแบบเดียวกับเอ็นซัยม์แลคเตท ดีไฮโดรจิเนส

GPI

อิเล็คโตรดบัฟเฟอร์ : 6 กรัม tris และ 30 มิลลิลิตร 1 N HCl ในน้ำ 1 ลิตร pH 8.0

เจลบัฟเฟอร์ : อิเล็คโตรดบัฟเฟอร์เจือจาง 1 : 5

กระแสไฟฟ้า : 75 มิลลิแอมแปร์คงที่

ระยะเวลา : 4 ชั่วโมง

Pep E

อิเล็คโตรดบัฟเฟอร์ : 0.227 M trisphosphate, pH 8.0

เจลบัฟเฟอร์ : อิเล็คโตรดบัฟเฟอร์เจือจาง 1 : 10

กระแสไฟฟ้า : 55 โวลท์คงที่

ระยะเวลา : 15.5 ชั่วโมง

6PGD

อิเล็คโตรดบัฟเฟอร์ : 0.1 M phosphate, pH 7.0

เจลบัฟเฟอร์ : อิเล็คโตรดบัฟเฟอร์เจือจาง 1 : 10

กระแสไฟฟ้า : 45 โวลท์คงที่

ระยะเวลา : 15.5 ชั่วโมง

2.4.6.3 วิธีย้อมสีสตาร์ชเจล แผ่นสตาร์ชเจลซึ่งผ่านกระแสไฟฟ้าแยกรูปแบบไอโซซัยม์แล้วจะถูกนำมาผ่านครึ่งตามความหนาออกเป็น 2 แผ่นเท่า ๆ กัน ก่อนจะนำมาย้อมสีด้านรอยผ่าน ทั้งนี้เนื่องจากด้านรอยผ่านนี้ สีและเอ็นซัยม์จะมีมาพบ และทำปฏิกิริยากันได้ดีที่สุด ดังนั้นสำหรับเอ็นซัยม์ซึ่งใช้เจลบัฟเฟอร์และอิเล็คโตรดบัฟเฟอร์เหมือนกัน ทำเจลเพียง 1 แผ่น ก็สามารถย้อมได้ 2 เอ็นซัยม์

สารละลายสีย้อมของเอ็นซัยม์ทั้ง 5 ใช้สารละลายสีย้อมของแต่ละเอ็นซัยม์เหมือนกับที่ใช้ย้อมโปลีอะคริละมไดเจล แต่เพิ่มปริมาตรบัฟเฟอร์เป็น 50 มิลลิลิตร โดยแบ่ง 25 มิลลิลิตรมาต้มกับ 0.4 กรัม Noble Agar จนละลายใส ทิ้งให้อุณประมาณ 40-50° C

ผสมวุ้นกับสารละลายสี 25 มิลลิลิตรที่เหลือ เทลงบนรอยฝานของสตาร์ชเจล ตั้งทิ้งให้วุ้นแข็งตัว นำแผนสตาร์ชเจลที่ย้อมสีเข้าในตู้อบอุณหภูมิ 40°C นาน 1/2-1 ชั่วโมง แถบไอโซซัยม์จะปรากฏบนเจล

2.4.6.4 วิธีบันทึกผลรูปแบบไอโซซัยม์จากสตาร์ชเจล ทำได้2 วิธีคือโดยวิธีลอกแบบและถ่ายภาพดังใน 2.4.1.5

2.4.7 วิธีเปรียบเทียบผลของการศึกษาเอ็นซัยม์ LDH, GDH, GPI, PepE และ 6 PGD ในตัวอย่างเลือดที่ติดเชื้อ P. falciparum ระหว่างเทคนิคโปลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโตรฟอรีซิสกับสตาร์ชเจล อิเล็คโตรฟอรีซิส เปรียบเทียบโดยใช้ตัวอย่างเชื้อ P. falciparum ไอโซเลทเดียวกันศึกษารูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์แต่ละตัวทั้งโดยวิธีโปลีอะคริลาไมด์เจล อิเล็คโตรฟอรีซิสและสตาร์ชเจล อิเล็คโตรฟอรีซิส สำหรับเอ็นซัยม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนสนั้นเนื่องจากปริมาตรของตัวอย่างเลือดที่บรรจุใส่เจลเพื่อแยกไอโซซัยม์ในทั้งสองเทคนิคเท่า ๆ กัน จึงเปรียบเทียบได้ง่ายโดยใช้ตัวอย่างเดียวกันและปริมาตรเท่ากันศึกษาพร้อมกันทั้งสองวิธี ส่วนเอ็นซัยม์ GPI, GDH, PepE และ 6 PGD นั้นเปรียบเทียบในลักษณะเดียวกับการศึกษาแลคเตท ดีไฮโดรจีเนสไม่ได้ เนื่องจากปริมาตรของตัวอย่างเลือดที่บรรจุในโปลีอะคริลาไมด์เจลกับสตาร์ชเจลไม่เท่ากัน การเปรียบจึงเพียงแต่ดูความชัดเจนของแถบไอโซซัยม์ที่ปรากฏ จำนวนแถบไอโซซัยม์ที่พบและความชัดเจนของการแยกแถบไอโซซัยม์ออกจากกัน เวลาที่ใช้ในการทำอิเล็คโตรฟอรีซิสเท่านั้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ ๓

ผลการทดลอง

๓.๑ ผลการศึกษารูปแบบไอโซซัยม์ของแลคเตท ดีไฮโดรจีเนสโดยโปลีอะคริละไมด์เจล อิเล็คโตรฟอรีซิส

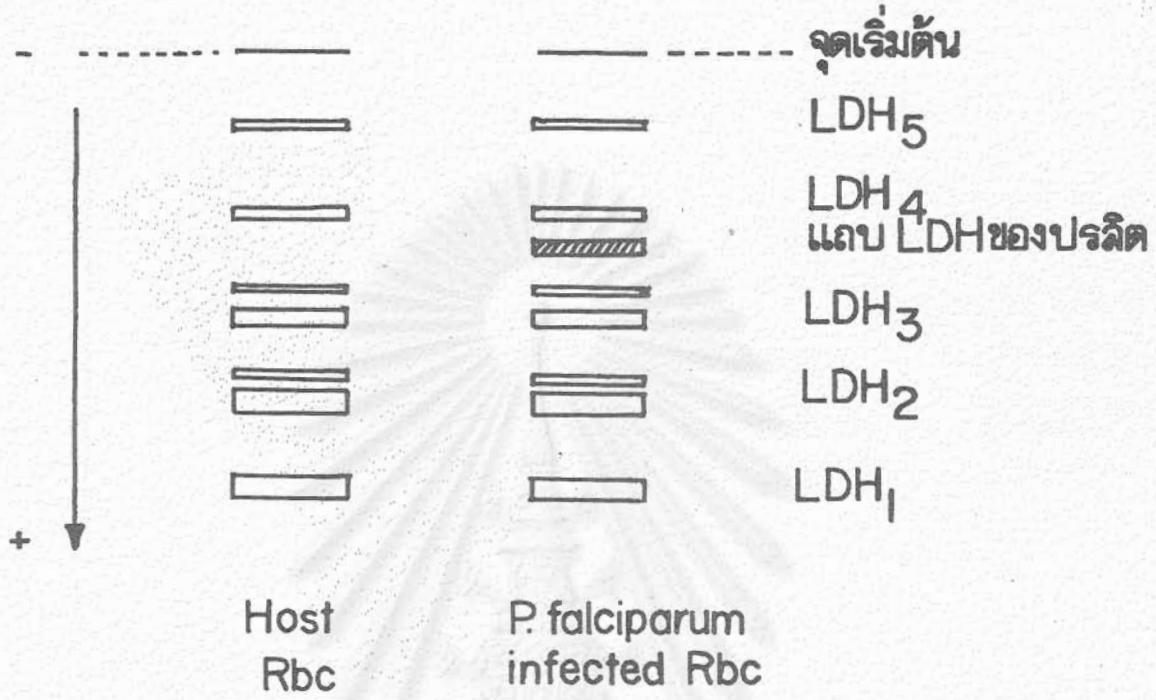
รูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์แลคเตท ดีไฮโดรจีเนสที่พบในเม็ดเลือดแดง จะพบแถบไอโซซัยม์ทั้งหมด ๗ แถบแบ่งเป็น ๕ ชนิด ชนิดที่อยู่บนสุดของแผ่นเจลใกล้จุดเริ่มต้นคือ LDH_5 มีหนึ่งแถบ ชนิดที่สองคือ LDH_4 มีหนึ่งแถบ ชนิดที่สามและสี่มีอย่างละ ๒ แถบหนาหนึ่งบางหนึ่ง คือ LDH_3 และ LDH_2 ส่วน LDH_1 จะอยู่ใกล้ที่สุดจึงอยู่ใกล้ขั้วบวกที่สุดมีหนึ่งแถบ (ดังในรูปที่ ๓, ๔)

ในการศึกษารูปแบบไอโซซัยม์ของแลคเตท ดีไฮโดรจีเนสของเชื้อมาลาเรีย P. falciparum ได้เก็บตัวอย่างทั้งหมด ๒๖ ไอโซเลทโดยเก็บจากจังหวัดจันทบุรี ชลบุรี ๙ ตัวอย่าง จังหวัดตากและสระบุรี ๑๒ ตัวอย่าง กาญจนบุรี และสงขลาแห่งละ ๑ ตัวอย่าง P. falciparum จากอินโดเนเซีย กับประเทศจีนอีกแห่งละ ๑ ตัวอย่าง ทั้ง ๒๖ ไอโซเลทของP. falciparum ให้รูปแบบไอโซซัยม์ของแลคเตท ดีไฮโดรจีเนสเหมือนกันคือ พบแถบเอ็นซัยม์ของปาราสิตเพียงหนึ่งแถบอยู่หน้าต่อ LDH_4 เล็กน้อยแต่แยกออกจาก LDH_4 ได้ชัดเจน (รูปที่ ๓,๔)

๓.๒ ผลการศึกษารูปแบบไอโซซัยม์ของกลูตาเมท ดีไฮโดรจีเนสโดยวิธีโปลีอะคริละไมด์เจล อิเล็คโตรฟอรีซิส

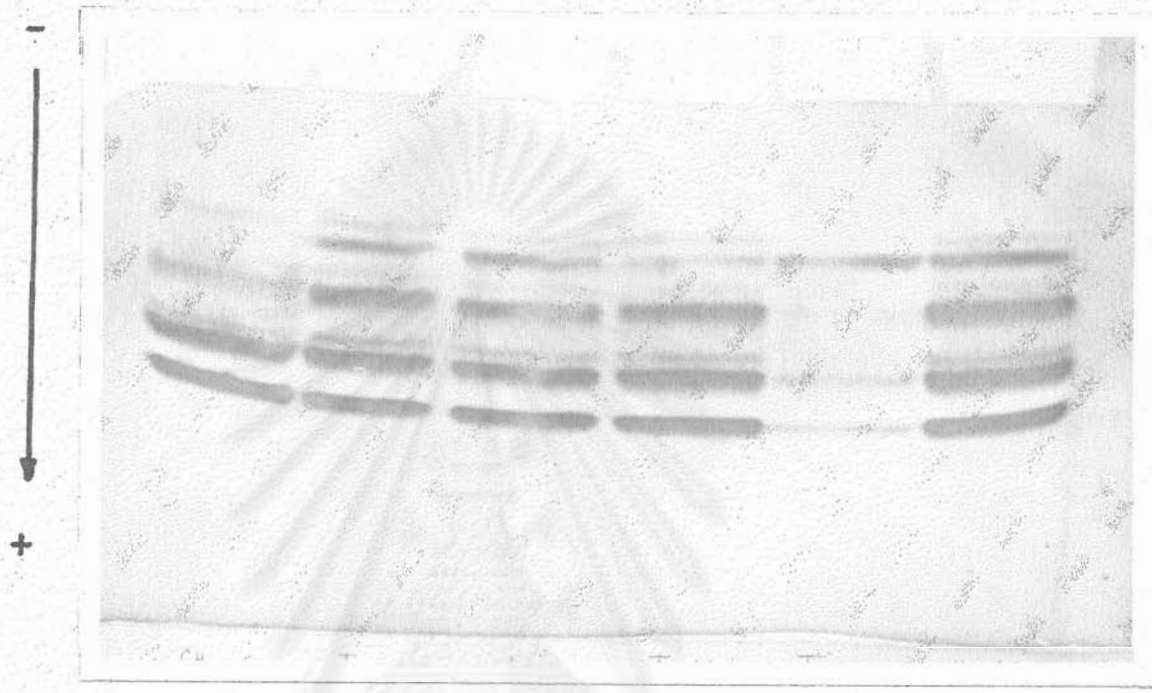
เม็ดเลือดแดงของคนซึ่งเป็นโฮสท์ (host) ของเชื้อมาลาเรียไม่มีเอ็นซัยม์กลูตาเมท ดีไฮโดรจีเนส ดังนั้นในช่องบรรจุของเจลซึ่งบรรจุตัวอย่างเม็ดเลือดแดงที่ปราศจากเชื้อจึงไม่ปรากฏแถบสีม่วง ส่วนตัวอย่างเลือดที่มีปาราสิตจะพบแถบสีม่วงซึ่งเป็นแถบเอ็นซัยม์กลูตาเมท ดีไฮโดรจีเนสของ P. falciparum เพียง ๑ แถบ วิ่งมาทางขั้วบวกห่างจากจุดเริ่มต้น ๑-๒ เซนติเมตรเหมือนกันหมดทั้ง ๒๖ ไอโซเลทที่ได้ทำการศึกษา (รูปที่ ๕,๖)

๓.๓ ผลการศึกษารูปแบบไอโซซัยม์ของกลูโคสฟอสเฟต ไอโซเมอเรสโดยวิธีโปลีอะคริละไมด์เจล อิเล็คโตรฟอรีซิส



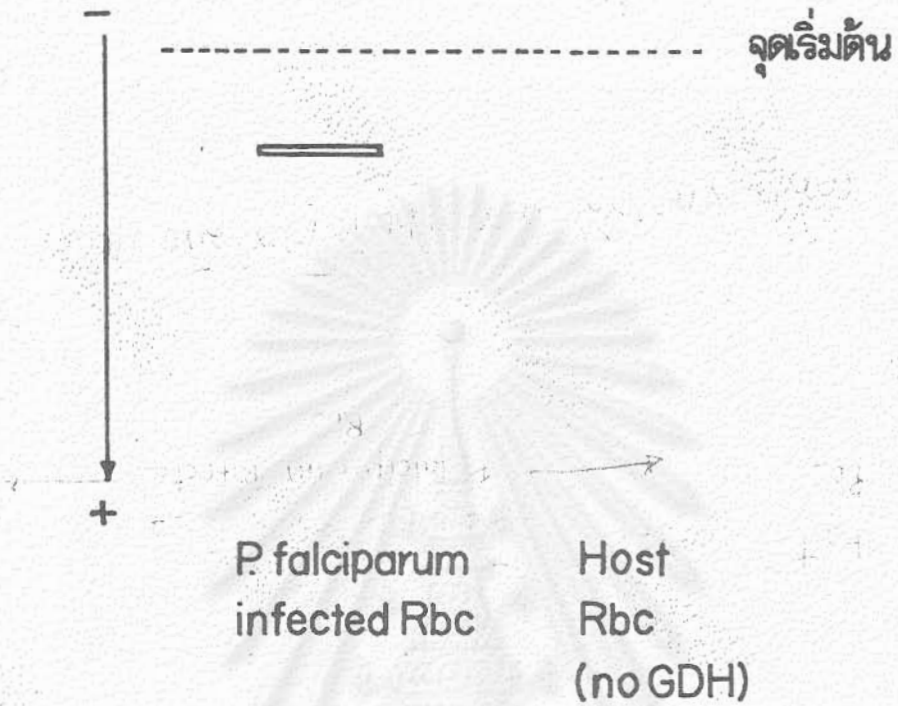
รูปที่ 3 แผนภาพแสดงการเคลื่อนที่ของแถบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ LDH ในโปลีอะคริละไมด์เจล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



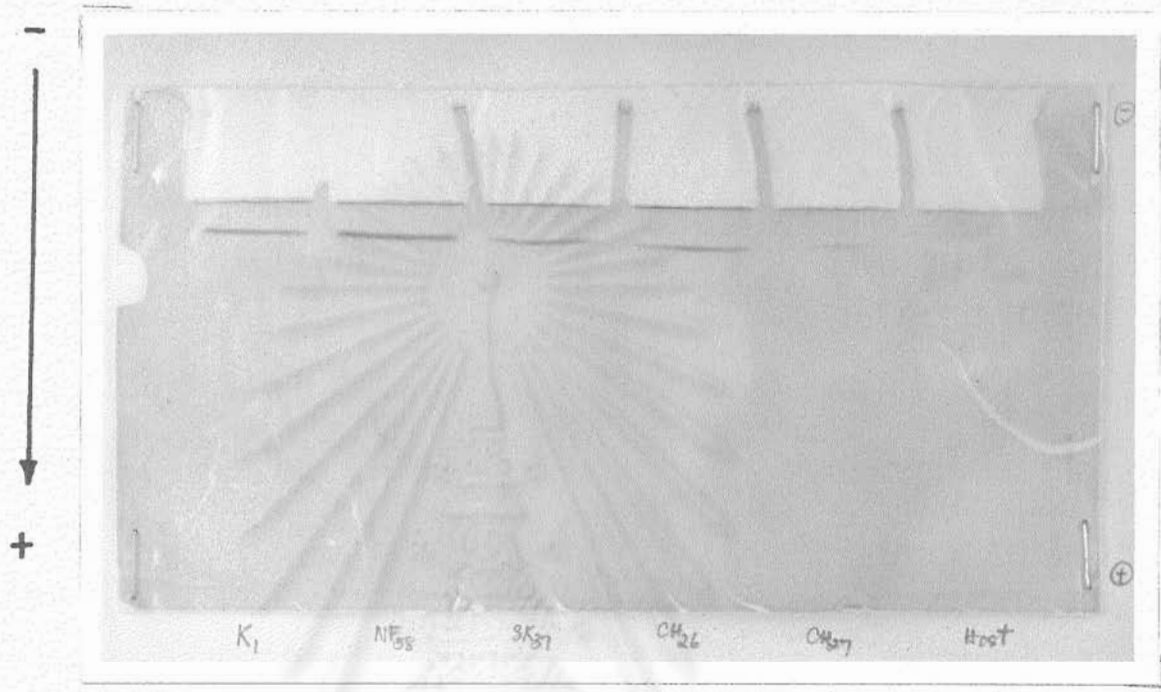
รูปที่ 4 ภาพแสดงการเคลื่อนที่ของแถบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ LDH

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 แผนภาพแสดงแถบเอ็นซัยม์กลูตาเมท ดีฮัยโดรจีเนส จะพบเฉพาะแถบเอ็นซัยม์ของปรสิต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



K_1 NF_{58} SK_{37} CH_{26} CH_{27} Host Rbc

รูปที่ 6 ภาพแสดงการเคลื่อนที่ของแถบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ GDH

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จะพบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรสในโปลีอะคริละไมด์เจลได้ ๒ แบบเรียกว่า GPI_1 และ GPI_2 แถบ GPI จะเคลื่อนที่ห่างจากจุดเริ่มต้นไปไกลกว่า GPI_2 ส่วนแถบเอ็นซัยม์ของเม็ดเลือดแดงในอิเล็คโตรฟอรีซิสระบบนี้จะเห็นเป็นแถบสีม่วงจาง ๆ ติดอยู่ที่เจลบริเวณที่บรรจุตัวอย่าง (รูปที่ ๗,๘)

๓.๔ ผลการศึกษารูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์เปปติเดสอีโดยโปลีอะคริละไมด์เจล อิเล็คโตรฟอรีซิส

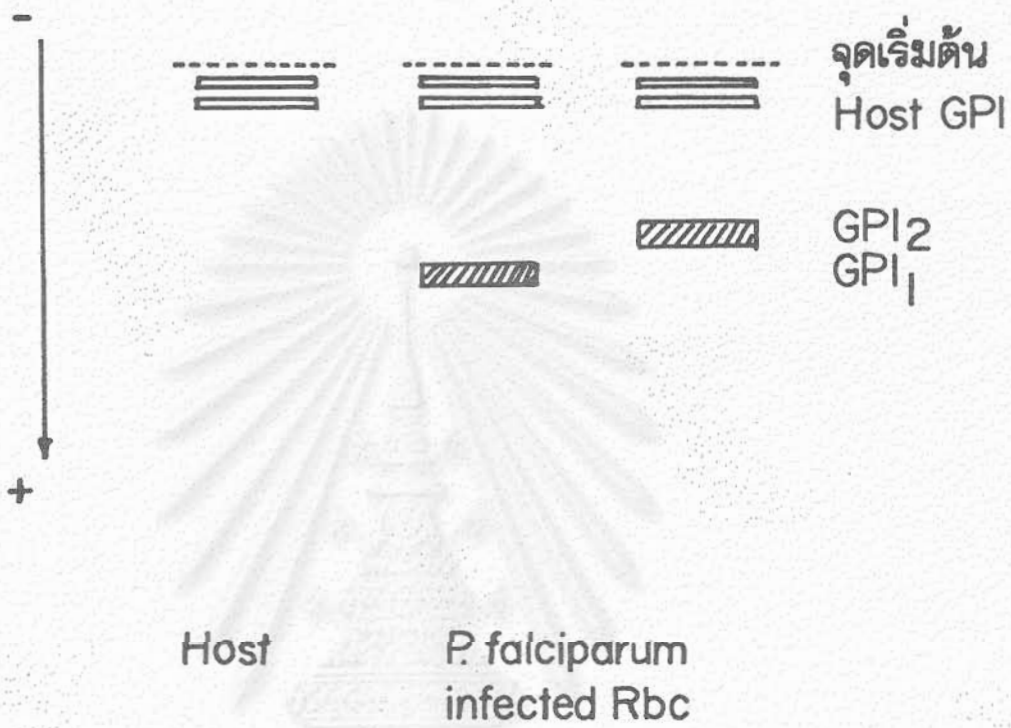
ไอโซซัยม์ของเปปติเดส อี ในเม็ดเลือดแดงที่ปราศจากเชื้อมาลาเรียจะพบเป็น ๑ แถบ เคลื่อนที่มาทางขั้วบวกได้ไกลจากแถบไอโซซัยม์ของเปปติเดส อี จาก P. falciparum อย่างเด่นชัด แถบไอโซซัยม์ของปรสิตจะพบได้ ๓ แถบ แถบที่ติดสีเข้มที่สุดจะใกล้ขั้วบวกมากกว่าอีก ๒ แถบซึ่งติดสีจางดังในรูปที่ ๙ และ ๑๐

๓.๕ ผลการศึกษารูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ 6-ฟอสฟอกลูโคเนท ดีไฮโดรจีเนส (6PGD) โดยโปลีอะคริละไมด์เจล อิเล็คโตรฟอรีซิส

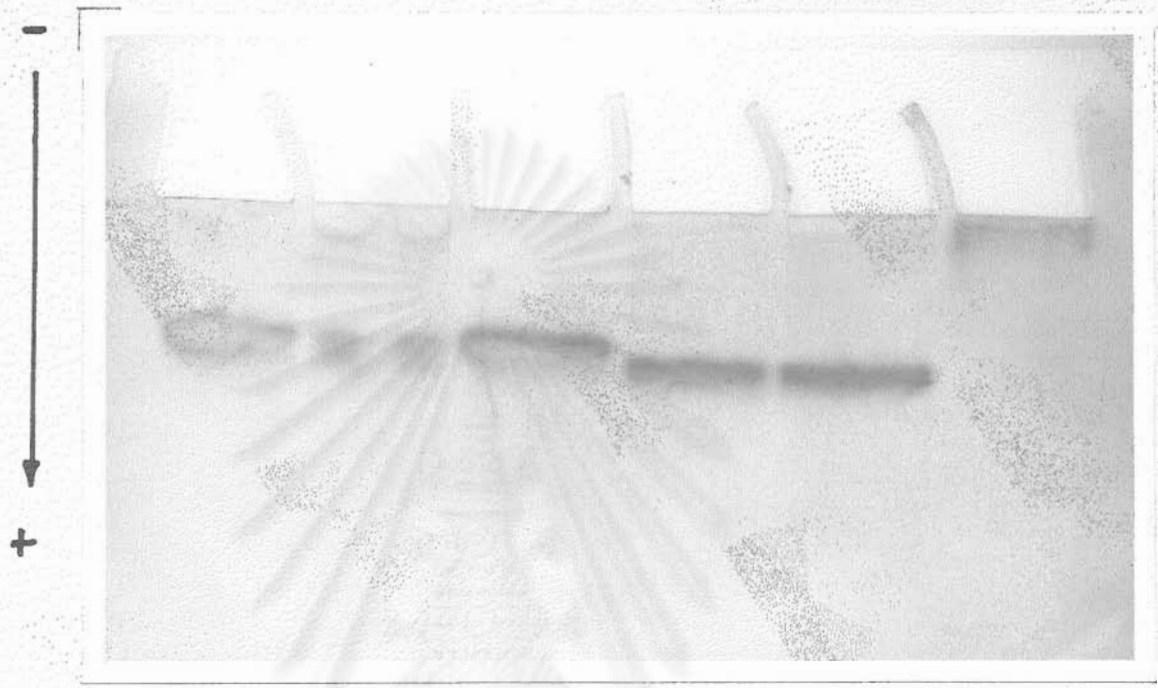
การศึกษาเอ็นซัยม์ตัวนี้ต้องเปลี่ยนบัฟเฟอร์จาก Tris/HCl และ Tris glycine มาเป็น phosphate/phosphate citrate จึงจะพบไอโซซัยม์ของปรสิตเป็นแถบเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวกได้เร็วกว่าแถบเอ็นซัยม์ของเม็ดเลือดแดงซึ่งมี ๑ แถบ เช่นกัน ในตัวอย่างที่พบแถบเอ็นซัยม์ 6PGD เคลื่อนที่เร็วเป็นสองแถบ เช่นใน isolate T_{46} นั้น เมื่อตรวจสไลด์ของเชื้อเพาะเลี้ยง จะพบว่ามีการปนเปื้อนจากเชื้อรา จึงเข้าใจว่าแถบที่เคลื่อนที่เร็วที่สุดนั้นเป็นเอ็นซัยม์ 6PGD ของเชื้อรามากกว่าดังในรูปที่ ๑๑, ๑๒

๓.๖ ผลการศึกษาเอ็นซัยม์ LDH, GDH, GPI, Pep E และ 6PGD โดยวิธีสตาร์ชเจล อิเล็คโตรฟอรีซิส

รูปแบบของ LDH และ GDH ที่พบในสตาร์ชเจลจะเหมือนกันในโปลีอะคริละไมด์เจล คือ พบแถบเอ็นซัยม์ของปรสิตชนิดละ ๑ แถบเคลื่อนที่มาทางขั้วบวกดังในรายงานของ Thaithong และคณะ, ๑๙๘๑ (รูปที่ ๑๓) ส่วนไอโซซัยม์ของ GPI ในปรสิตมี ๒ รูปแบบ แบบที่เรียกว่า GPI_1 จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าแบบที่เรียกว่า GPI_2 ส่วนไอโซซัยม์ของเม็ดเลือดแดงพบได้ ๒ แถบเคลื่อนที่ไปทางขั้วลบ (รูปที่ ๑๓)



รูปที่ 7 แผนภาพแสดงไฮโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ GPI ที่พบในโปลีอะคริละไมด์เจล

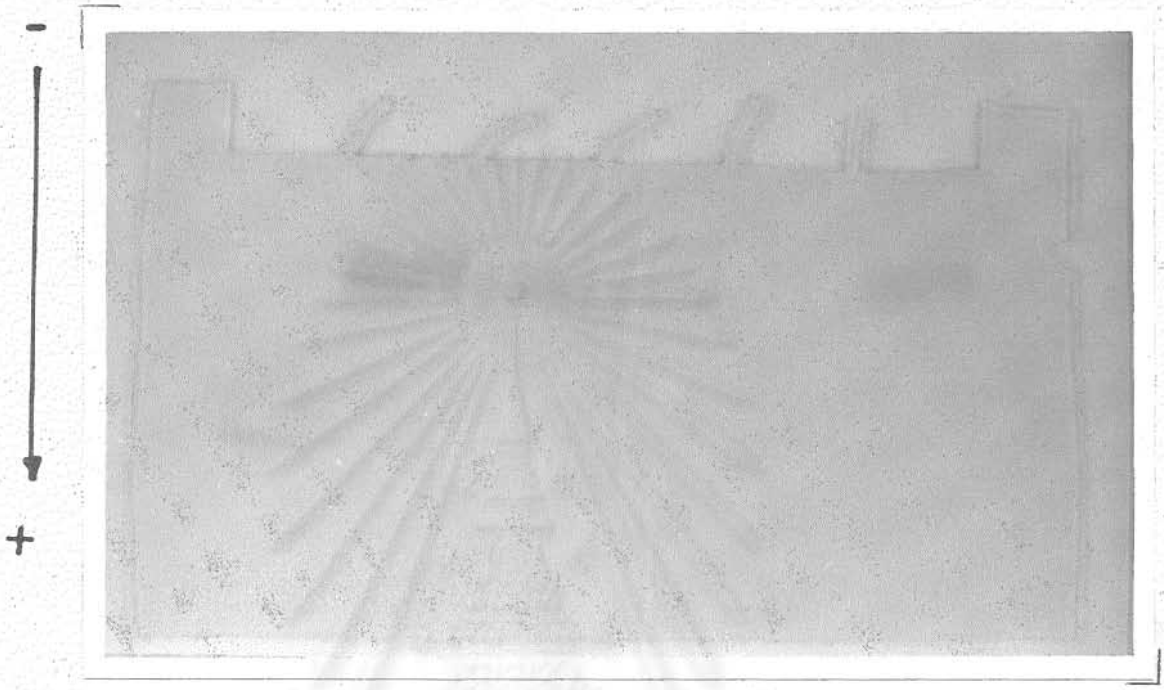


รูปที่ 8 ภาพแสดงการเคลื่อนที่ของแถบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ GPI

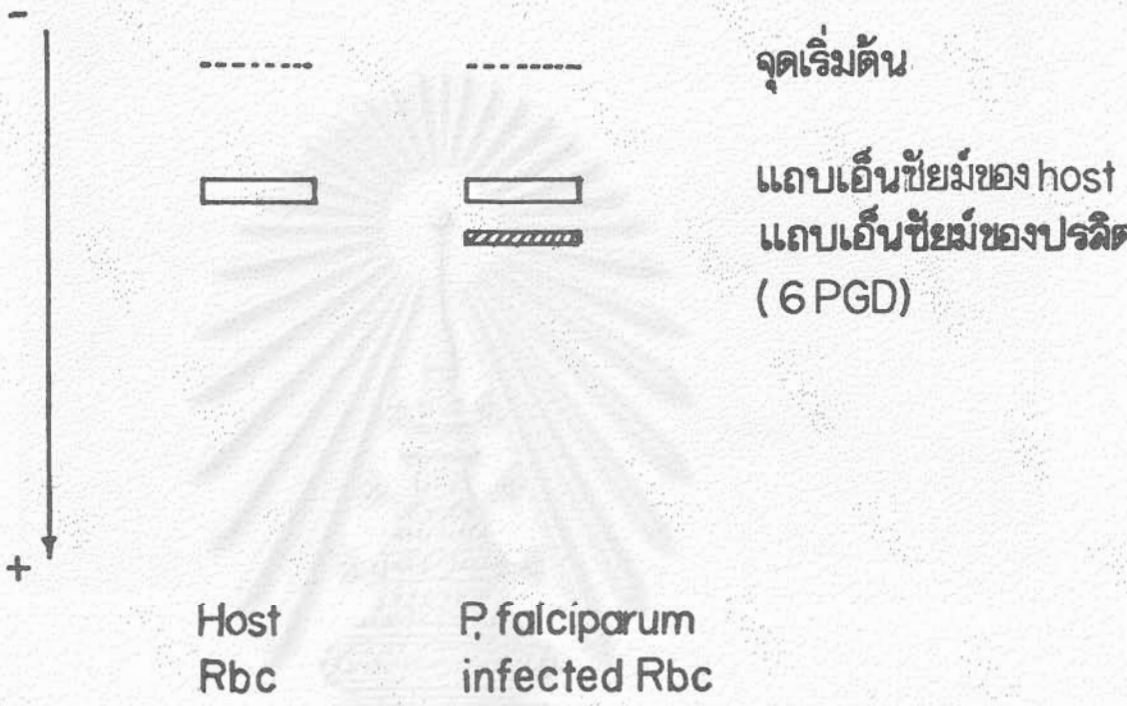
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 9 แผนภาพแสดงแถบไฮโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ peptidase E ซึ่งเอ็นซัยม์ของเม็ดเลือดเคลื่อนที่เร็วกว่าของปรสิต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

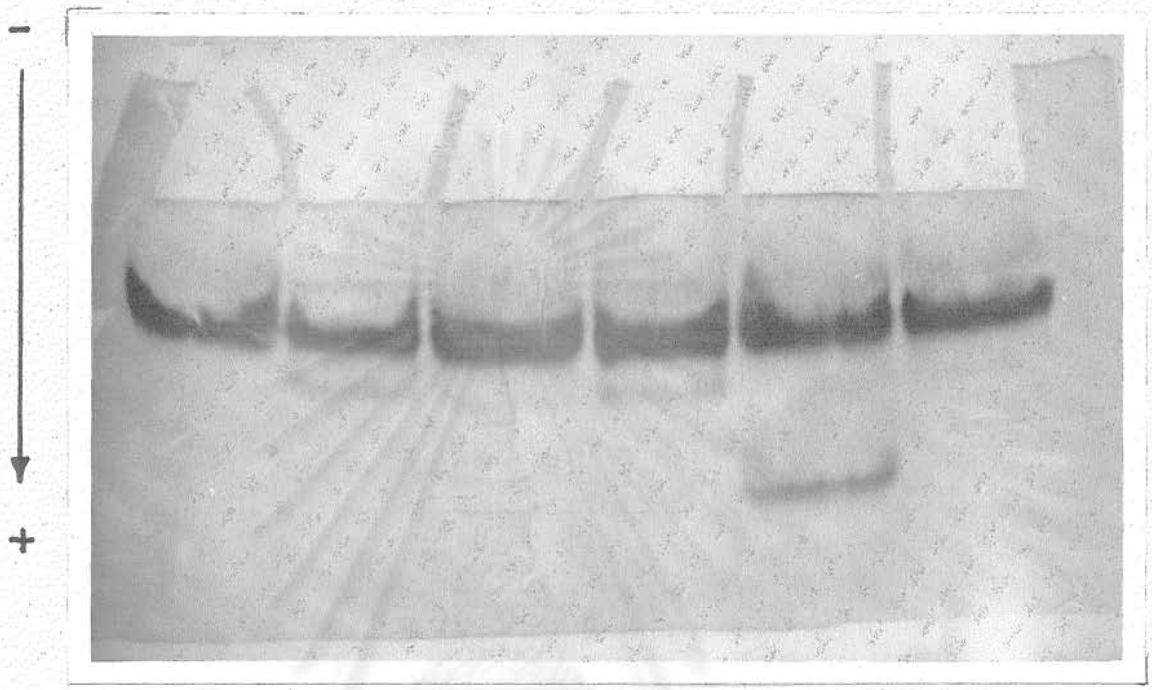


รูปที่ 10 ภาพแสดงการเคลื่อนที่ของแถบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ Pep.E



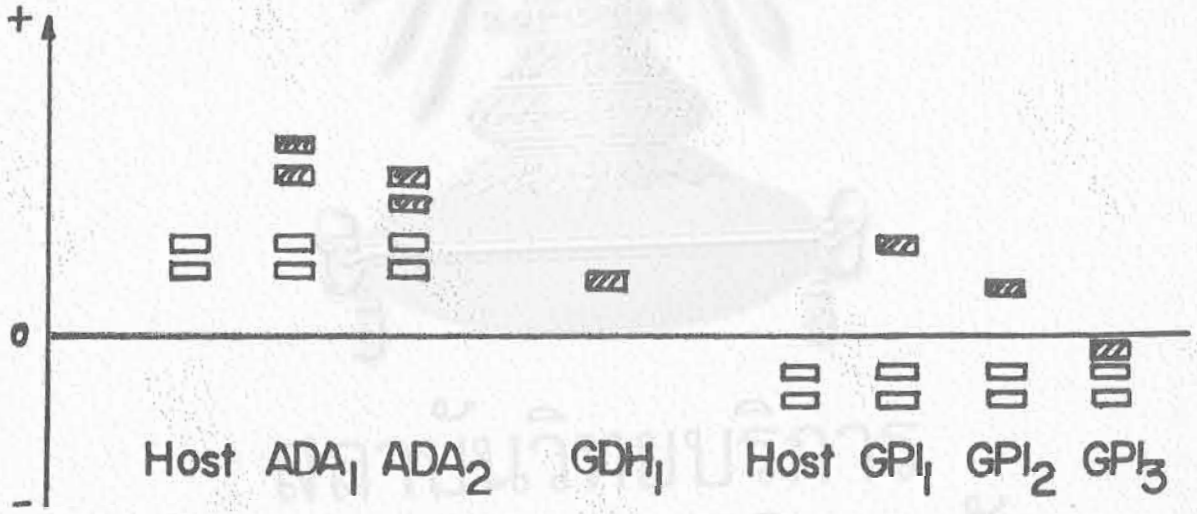
รูปที่ 11 แผนภาพแสดงแถบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ 6-PGD ในโปลีอะคริละไมด์เจล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 ภาพแสดงการเคลื่อนที่ของแถบไฮโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ 6 PGD, ตัวอย่าง T_{46} มีเอ็นซัยม์ของเชื้อราปนอยู่อาจเข้าใจผิดเป็น $6PGD_2$

รูปที่ 13 รูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ ADA, GDH และ GPI ที่พบในเชื้อ P. falciparum โดยสตาร์ชเจล อิเล็คโตรฟอรีซิส (Thaithong, Sueblinvong & Beale, 1981)



แถบเปปติเดส อี ไอโซซัยม์ของ P. falciparum จะพบเป็นแถบสีน้ำตาลอมส้ม แถบค่อนข้างหนาใหญ่ ๑ แถบเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวกแต่อยู่ใกล้จุดเริ่มต้นมากกว่าแถบเอ็นซัยม์ของเม็ดเลือดแดง ส่วนแถบไอโซซัยม์ของ 6PGD จากปรสิตจะพบเพียง ๑ แถบเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวกได้ไกลกว่าแถบเอ็นไซม์ 6PGD ของเม็ดเลือดแดง (รูปที่ ๑๔)

๓.๗ ผลการเปรียบเทียบการศึกษาเอ็นซัยม์ LDH, GDH, GPI, PepE และ 6 PGD พบว่าการศึกษาเอ็นซัยม์ LDH โดยโปลีอะคริละไมด์สามารถทำได้เร็วและเสร็จภายในวันเดียว นอกจากนี้ลักษณะของแถบไอโซซัยม์ที่พบในโปลีอะคริละไมด์เจลจะคมชัดกว่าในสตาร์ชเจลมาก ทั้งยังสามารถจะทำให้แผ่นโปลีอะคริละไมด์เจลแห้งติดบนกระดาษกรองและเก็บไว้ได้โดยไม่ต้องถ่ายรูป หรือทำการลอก

ผลของ GDH ในโปลีอะคริละไมด์เจลไม่ต่างจากสตาร์ชเจลนอกจากข้อได้เปรียบที่โปลีอะคริละไมด์เจลสามารถจะเก็บถาวร และการทำอิเล็คโตรฟอรีซิสกินเวลาน้อยกว่าแต่ข้อเสียคือต้องใช้ปริมาตรของตัวอย่างเลือดใส่ในโปลีอะคริละไมด์เจลมากกว่าในสตาร์ชเจล

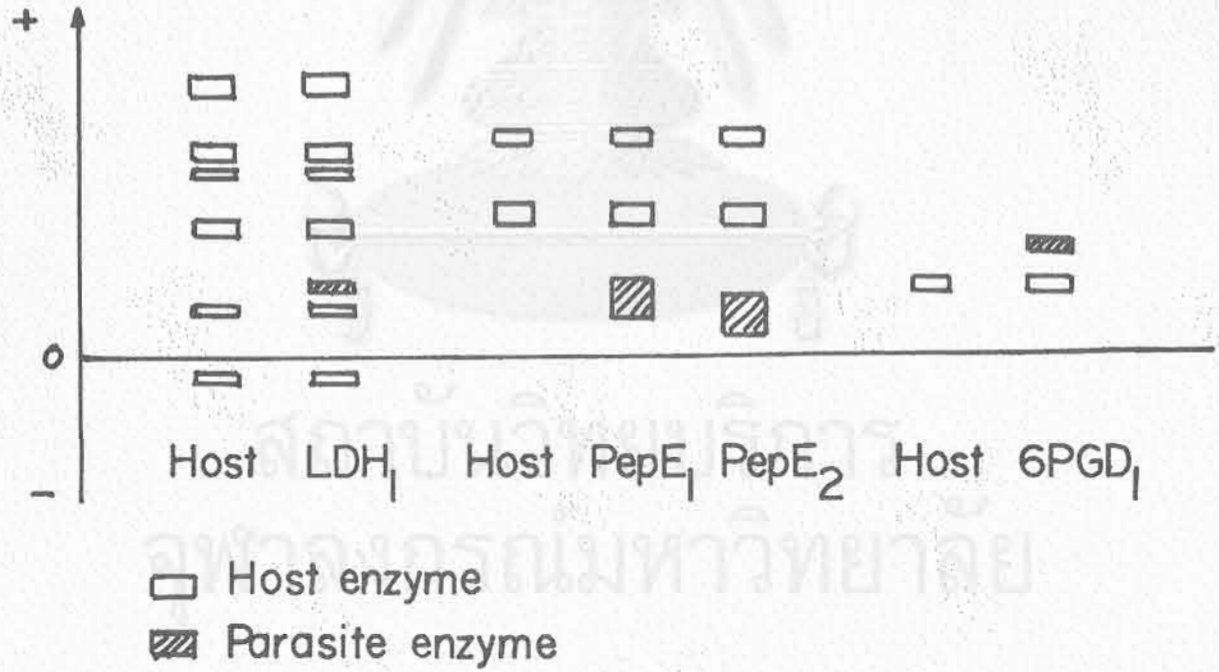
ผลของ GPI โดยสตาร์ชเจลให้แถบไอโซซัยม์ที่เด่นชัดทั้งของปรสิตและเม็ดแดง และยังสามารถแยก GPI_1 ออกจาก GPI_2 อย่างเด่นชัดโดยใช้ปริมาตรของสารตัวอย่างไม่มาก กับทั้งใช้เวลาในการทำอิเล็คโตรฟอรีซิสพอ ๆ กับอะคริละไมด์เจล

ส่วน PepE ให้แถบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์จากปรสิตมากแถบกว่าที่พบในสตาร์ชเจล แต่ยังไม่พบรูปแบบที่แปลก (variation) จึงไม่ต่างจากการศึกษาโดยสตาร์ชเจลนัก

ไอโซซัยม์ของ 6PGD จากปรสิตและเม็ดเลือดแดงให้ผลในอิเล็กโตรฟอรีซิสเหมือนกัน ไม่ว่าจะเป็นสตาร์ชเจลหรือโปลีอะคริละไมด์เจล ปริมาตรของตัวอย่างเลือดที่ใช้สำหรับศึกษา 6PGD โดยโปลีอะคริละไมด์เจลจะมากกว่าโดยสตาร์ชเจลแต่ใช้เวลาในการทำอิเล็คโตร-ฟอรีซีสโดยวิธีแรกน้อยกว่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 14 รูปแบบไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ LDH, Pep E และ 6 PGD ที่พบในเชื้อ P falciparum โดยสตาร์ชเจล อิเล็คโตรฟอรีซิส (Thaithong, Sueblinvong & Beale, 1981)



บทที่ ๔
วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ LDH GDH GPI 6PGD และ PepE สามารถทำได้ทั้งโดยวิธีสตาร์ชเจลอิเล็กโตรฟอรีซิส และโปลีอะคริละไมด์เจลอิเล็คโตรฟอรีซีส โดยที่ทั้งสองเทคนิคต่างมีข้อดีและข้อเสีย สำหรับสตาร์ชเจลมีข้อเสียคือสิ้นเปลืองเวลาในการเตรียมเจลและทำอิเล็คโตรฟอรีซิสมาก ทั้งยังไม่อาจเก็บสตาร์ชเจลไว้ถาวรได้ แต่สตาร์ชเจลใช้ได้ผลดีในการศึกษาเอ็นซัยม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส เนื่องจากใช้ตัวอย่างน้อยและใช้แยกเอ็นซัยม์ของ P. falciparum ออกเป็น GPI_1 และ GPI_2 ได้ชัดเจน

โปลีอะคริละไมด์เจลมีข้อดีคือสามารถจะแปรผันสภาวะได้หลายประการ เช่นเปลี่ยน pH หรือทำให้แผ่นเจลมี pH gradient โดยการเติม ampholine เปลี่ยนความเข้มข้นของเจลหรือทำให้เกิด gel gradient ได้ นอกจากนี้ปริมาตรของตัวอย่างที่บรรจุใส่เจลเพื่อทำการแยกด้วยไฟฟ้ายังเปลี่ยนแปลงได้และอาจเพิ่มได้ถึง 100 ul สำหรับเจลที่มีความหนาเพียง ๑ มิลลิเมตร

โปลีอะคริละไมด์เจลอิเล็กโตรฟอรีซิสเมื่อนำมาใช้ศึกษาเอ็นซัยม์ LDH จะให้ผลดีมากในเรื่องความคมชัดของแถบเอ็นซัยม์ดังที่รายงานไว้โดย Dietz และคณะ (1967) นอกจากนี้การแยกไอโซซัยม์ของเอ็นซัยม์ 6PGD และ PepE ยังให้ความคมชัด ของแถบเอ็นซัยม์โดยเฉพาะ PepE จะให้แถบเอ็นซัยม์ของปรสิตชัดเจนกว่าที่ศึกษาโดยสตาร์ชเจล

ในการศึกษานี้ยังได้ใช้เทคนิคของโปลีอะคริละไมด์เจลศึกษาเอ็นซัยม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีฮัยโดรจิเนส (G-6-PD; EC 1.1.1.49) ของเชื้อ P.falciparum ด้วยวิธีซึ่งรายงานโดย Hempelmann และคณะ (1981) เอ็นซัยม์ G-6-PD เป็นเอ็นซัยม์ตัวแรกในวิถี pentose phosphate pathway และเป็นเอ็นซัยม์ที่ Sherman (1979) ยืนยันว่าไม่พบในเชื้อมาลาเรียโดยเฉพาะเชื้อ P.falciparum แต่ผู้วิจัยได้ศึกษาเอ็นซัยม์ G-6-PD ใน P.falciparum ซึ่งเก็บตัวอย่างจากเลือดผู้ป่วยมาลาเรียซึ่งมารับการตรวจรักษาตามศูนย์บริการมาลาเรียของกระทรวงสาธารณสุขที่จังหวัด ตาก กาญจนบุรี สงขลาและจันทบุรี โดยนำเชื้อ P. falciparum จากผู้ป่วยมาเพาะเลี้ยงจนได้จำนวนเชื้อ

ปรสิต ๓% ขึ้นไปแยกเฉพาะระยะ schizont และ trophozoite มาศึกษาเอ็นซัยม์ ซึ่งผลปรากฏว่าสามารถพบแถบไอโซซัยม์G-6-PD ของ P.falciparum เป็นแถบสีม่วงเพียง ๑ แถบ เกลื่อนที่ช้ากว่าแถบเอ็นซัยม์ G-6-PD ของเม็ดเลือดแดงมาก รายละเอียดในการศึกษาเอ็นซัยม์ G-6-PD ในเชื้อ P.falciparum ได้รายงานไว้ในจุฬาลงกรณ์เวชสาร ฉบับปีที่ ๒๗ ฉบับที่ ๓ พฤษภาคม ๒๕๒๖ หน้า ๑๑๗-๑๒๖ และได้นำออกมาเผยแพร่ในลักษณะของโปสเตอร์ใน Third FAOB เมื่อวันที่ ๓๐ พฤศจิกายน ๒๕๖๖ ณ. โรงแรมรอยัลออคิด ถนนสี่พระยา กรุงเทพฯ

การศึกษาเอ็นซัยม์ใน P.falciparum อาจจะใช้วิธี เซลลูโลส อะซีเตท อิเล็คโตรฟอริซีสได้ ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาเอ็นซัยม์ LDH, GDH, GPI, 6PGD Pep.E และ ADA Adenine deaminase; EC 3;5;4.4) โดยเซลลูโลส อะซีเตท อิเล็คโตรฟอริซีส ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้สะดวก รวดเร็ว เนื่องจากใช้เวลาศึกษาเอ็นซัยม์ทั้ง ๖ ตัวได้เสร็จภายใน ๑-๒ ชั่วโมง แต่ข้อเสียคือแผ่นเซลลูโลส อะซีเตทราคาค่อนข้างแพงมาก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ ๕

สรุปผลการทดลอง

รายงานนี้ได้เสนอวิธีศึกษาเอ็นซัยม์ GDH, LDH, GPI, 6PGD และ PepE โดยวิธีโปลีอะคริละไมด์เจลอีเล็คโตรฟ่อริซีสทั้งยังรายงานถึงการพบเอ็นซัยม์ G-6-PD ใน P.falciparum โดยวิธีเดียวกัน

สตาร์ชเจลอิเล็คโตรฟ่อริซีสยังเป็นเทคนิคที่ใช้ได้ดีในการศึกษาเอ็นซัยม์ทั้ง ๕ ตัว ดังกล่าวถึงแม้จะสิ้นเปลืองเวลามากกว่าและไม่อาจเก็บแผ่นเจลอย่างถาวรก็ตาม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. Brodie, H.D., and Ryckman, R.E., 1967, J. Med. Entom. 4, 497.

2. Carter, R., 1970, Trans. Roy. Soc. Trop. Med and Hyg. 64, 401.

3. Carter, R., and Mc. Gregor, I.A., 1973, Trans. Roy. Soc. Trop. Med & Hyg., 63, 830.

4. Carter, R., and Voller, A., 1975, Trans. Roy. Soc. Trop. Med and Hyg., 69, 371.

5. Carter, R., and Walliker, D., 1977, Bull. World. Hlth. Org. 55 (2-3), 339.

6. Chrambach, A., and Rodbard D., 1971, Science 172, 440.

7. Dietz, A.A. and Lubrano. I., 1967, Anal. Biochem. 20, 246.

8. Harris, H and Hopkinson, DA. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics, Amsterdam : North Holland Publishing Company, 1976.

9. Hempelmann, E., and Wilson, RJM., 1980, Parasitol 80, 323.

10. Kaplan, N.O. 1963, Bact. Rev. 27, 155.

11. Markert, C.L., and Moller, F., 1959, Proc, Nat. Acad. Sci (US) 45, 753.

12. Sherman, IW., 1979, Microbiol Rev 43, 453.

13. Singh, R.S., Lewontin, R.C., and Felton A.A., 1976, Genetics 84, 609.

* 14. Thaithong, S., Sueblinvong, T., and Beale, G.H., 1981, Trans. Roy. Soc. Trop. Med and Hyg., 75(2):268

15. Weber, K and Osborn, M., "The Proteins" 3rd edition, Vol, I (1975) edited by H. Hemath, R.C. Hill and C.L. Sorder, Acadenic Press, New York.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ ขอบพระคุณหัวหน้าภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ หัวหน้าภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งให้การสนับสนุนเป็นอย่างดียิ่ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย